

EFEKTIVITAS KHASIAT PENGOBATAN LUKA BAKAR SEDIAAN GEL MENGANDUNG FRAKSI EKSTRAK PEGAGAN BERDASARKAN ANALISIS HIDROKSIPROLIN DAN HISTOPATOLOGI PADA KULIT KELINCI

Eriawan Rismana^{*}, Idah Rosidah, Prasetyawan Y, Olivia Bunga dan Erna Y

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

^{*}E-mail : eriawan.rismana@bppt.go.id

Abstract :

The effectiveness of wound healing by gel topical formulation with three various containing Centella asiatica fraction extract has been studied. Wound Healing the wound was evaluated histopatologically by microscopy observation and histochemically by hydroxyprolin content on the tissues samples. The histochemical and histopatological results shown that the hydroxyprolin content and degree of regeneration of rabbit tissues samples after treatment by gel formulation with 1.5 % C. asiatica fraction extract were the highest as compared to the other gel formulations, respectively. The goal of the study was formulation, effectiveness and safety in promoting wound healing data of gel formulation.

Keywords : Wound healing, histochemically, histopatologically, Centella asiatica fraction extract

Abstrak :

Studi uji khasiat penyembuhan luka bakar dari formula sediaan topikal bentuk gel yang mengandung fraksi ekstrak *Centella asiatica* (Pegagan) telah dilakukan menggunakan tiga konsentrasi fraksi ekstrak yang berbeda. Khasiat penyembuhan luka bakar telah dievaluasi secara uji histopatologi melalui pengamatan mikroskopi dan histokimia dengan mengukur kandungan hidroksiprolin dalam jaringan kulit. Hasil uji histokimia dan histopatologi masing – masing menunjukkan bahwa kandungan hidroksiprolin dan derajat regenerasi pada jaringan kulit kelinci yang diobati dengan formulasi gel mengandung fraksi ekstrak *C. asiatica* 1,5 % adalah tertinggi dibandingkan dengan pengobatan menggunakan 2 formula lainnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan data formulasi, efektifitas khasiat dan keamanan dari formulasi sediaan gel luka bakar.

Kata Kunci : histochemically, histopatologically

PENDAHULUAN

Walaupun pada saat ini belum ada data resmi atau prevalensi mengenai kecelakaan luka bakar di Indonesia, diduga jumlah korban akibat peristiwa kecelakaan

luka bakar diberbagai lapisan masyarakat cenderung menunjukkan gejala peningkatan.

Sejumlah data yang dipublikasikan melaporkan bahwa di Indonesia lebih dari 250 jiwa meninggal per tahun akibat luka

bakar ^(1, 2). Data yang dikeluarkan unit luka bakar RSCM hampir 10 tahun lalu menunjukkan bahwa luka bakar terjadi 60% karena kecelakaan rumah tangga, 20% karena kecelakaan kerja, dan 20% sisanya karena sebab-sebab lain.

Luka bakar adalah kerusakan atau kehilangan jaringan yang disebabkan kontak dengan sumber panas seperti api, air panas, bahan kimia, listrik, dan radiasi ⁽³⁾. Jenis luka dapat beraneka ragam dan memiliki penanganan yang berbeda tergantung jenis jaringan yang terkena luka bakar, tingkat keparahan, dan komplikasi yang terjadi akibat luka tersebut. Luka bakar dapat merusak jaringan otot, tulang, pembuluh darah dan jaringan epidermis. Akibat luka bakar dapat menyebabkan komplikasi diantaranya *shock*, infeksi, ketidakseimbangan elektrolit dan masalah distress pernafasan. Selain itu dapat menyebabkan distress emosional dan psikologi yang berat dikarenakan cacat akibat luka bakar dan bekas luka ⁽²⁾.

Salah satu penanganan pada penderita luka bakar yaitu dengan mengobati luka tersebut menggunakan sediaan topikal, karena jaringan yang mengeras akibat luka bakar tidak dapat ditembus dengan pemberian obat dalam bentuk sediaan oral maupun parenteral. Pemberian sediaan topikal yang tepat dan efektif diharapkan dapat mengurangi dan mencegah infeksi pada luka. Bentuk sediaan gel topikal dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu, nyaman dipakai dan mudah meresap pada kulit, memberi rasa dingin, tidak lengket, dan mudah dicuci dengan air.

Indonesia adalah negara yang kaya akan sumber daya alam yang dapat digunakan untuk pengobatan luka bakar diantaranya adalah pegagan (*Centella asiatica* L.) Urban. Pegagan merupakan salah satu tanaman herbal famili *umbelifereae* yang telah banyak diteliti dan berkhasiat sebagai obat luka

bakar serta dapat menstimulasi kolagen pada jaringan kulit ^(4, 5, 6, 7, 8). Selain itu ekstrak pegagan mempunyai efek sebagai antinoseptik dan antiinflamasi yang dapat mensinergiskan pada pengobatan luka bakar ⁽⁹⁾. Komponen bioaktif triterpenoid dalam pegagan yaitu *asiaticoside*, *asiatic acid*, *madecassoside* dan *madecassic acid* mempunyai kemampuan sebagai obat luka bakar, antinoseptik dan antiinflamasi ^(10, 11, 12, 13, 14). Berdasarkan studi pustaka senyawa yang berperan untuk pengobatan luka bakar pada herba pegagan adalah *asiaticoside*, sehingga senyawa *asiaticoside* inilah yang dijadikan penanda dan diharapkan kadarnya setinggi mungkin dalam fraksi ekstrak yang akan digunakan saat formulasi ^(5, 6, 7, 8). *Asiaticoside* merupakan senyawa glikosida triterpenoid dan berdasarkan tingkat kepolarannya senyawa ini berada pada fase semipolar menuju polar, sehingga pada penelitian ini digunakan pelarut butanol untuk mendapatkan fraksi yang diperlukan untuk pembuatan formula sediaan. Fraksi herba pegagan dibuat dengan cara pemisahan ekstraksi berdasarkan tingkat kepolaran yakni berturut – turut menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan butanol. Proses ini bertujuan untuk meningkatkan kandungan senyawa yang dikehendaki dengan menghilangkan atau memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Keuntungan penggunaan fraksi dibandingkan dengan ekstrak total adalah penggunaannya dapat lebih mudah, lebih murni sehingga dosis yang digunakan jauh lebih kecil.

Berdasarkan banyaknya kejadian kecelakaan luka bakar serta ketersediaan bahan baku *C. asiatica* beserta khasiatnya untuk luka bakar, maka penelitian ini bertujuan untuk memformulasi serta mendapatkan data khasiat, dosis efektif dan keamanan dari formula sediaan topikal yang mengandung bahan aktif fraksi ekstrak pegagan sebagai obat luka bakar. Uji khasiat sediaan topikal dalam penelitian ini baru terbatas dilakukan

pada kelinci mengingat faktor keamanan, terutama bila terjadi efek samping jika dilakukan langsung terhadap manusia, seperti alergi dan efek tak terduga lainnya.

Penentuan uji khasiat pada penelitian ini hanya didasarkan pada uji histopatologi yakni mengamati jaringan kulit secara mikroskopi dan uji histokimia dengan mengukur kandungan hidroksiprolin. Pengujian khasiat berdasarkan uji histopatologi diperlukan untuk mengetahui adanya pembentukan jaringan atau regenerasi sel pada kulit yang telah diobati. Selain itu efektivitas khasiat penyembuhan luka bakar juga dapat dievaluasi berdasarkan pengamatan secara biokimia terhadap jaringan kulit yakni dengan mengukur kadar hidroksiprolin. Kadar hidroksiprolin dalam jaringan dapat digunakan sebagai indeks untuk menggantikan parameter kadar kolagen dalam kulit, karena seperti diketahui bahwa kolagen yang menjadi indeks terbentuknya jaringan/regenerasi kulit tersusun atas dua jenis yakni hidroksilisin dan hidroksiprolin. Semakin tinggi kandungan hidroksiprolin dapat diindikasikan adanya peningkatan sintesis kolagen yang berkorelasi dalam kecepatan proses penyembuhan luka.

Sedangkan manfaat dari hasil penelitian ini adalah tersedianya sediaan obat serta formula luka bakar alternatif yang mengandung fraksi ekstrak herbal dan sudah diuji khasiat serta keamanannya.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Basis sediaan gel dibuat dari metolose, propilenglikol, trietanolamin, nipagin, nipasol, pewangi, dan air. Fraksi ekstrak pegagan dibuat dengan cara fraksinasi. Untuk memenuhi standar dan kualitas, maka pada fraksi ekstrak pegagan terlebih dahulu dilakukan evaluasi dan karakterisasi, sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pegagan 0,5%

- 1,5 %, sediaan obat luka bakar yang ada di pasar (Kode OLB 1 dan OLB 2), Penobarbital, Dettol®, standar L-Hidroksiprolin (Sigma), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Merck), H_2SO_4 (Merck), H_2O_2 (Merck), HCl (Merck), NaCl (Ajax), NaOH (Scharlau).

Peralatan

Rak dan kandang kelinci, jarum suntik, timbangan hewan, alat-alat biopsi, alat-alat gelas, logam tembaga berdiameter ± 3 cm, hot plate, alat histologi, mikroskop, dan spektrofotometer.

Desain Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan penentuan jumlah hewan kelinci didasarkan pada rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$. Dengan jumlah perlakuan 6 kelompok maka didapatkan jumlah kelinci yang digunakan untuk ulangan adalah sebanyak 4 ekor. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Desain kelompok perlakuan untuk uji khasiat

	Formula Sediaan	Jumlah (ekor)
1 = kontrol negatif	Basis gel	4
2 = kontrol positif 1	Sediaan gel kode OLB 1	4
3 = kontrol positif 2	Sediaan krim kode OLB 2	4
4 = Perlakuan 1	Sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pegagan 0,5%	4
5 = Perlakuan 2	Sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pegagan 1,0%	4
6 = Perlakuan 3	Sediaan gel mengandung fraksi ekstrak pegagan 1,5%	4

Hewan coba dan pengelompokan hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah kelinci jantan jenis *New Zealand White* yang diperoleh dari Balai Penelitian Ternak (BALITNAK) Bogor. Kelinci yang digunakan adalah berjumlah 24 ekor, berusia 3-4 bulan dan berat badan 1,5 - 2,0 Kg serta dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Hewan kelinci ditempatkan dalam kandang terpisah yakni 1 ekor setiap kandang.

Pengujian Khasiat Luka Bakar

Pembuatan luka dan pengobatan luka dengan sediaan gel topikal

Uji khasiat luka bakar dilakukan dengan mengacu dan memodifikasi penelitian Kimura Yoshiyuki *et al.*, 2008⁽⁶⁾. Setiap kelinci dicukur bulunya pada bagian punggung dan paha, kemudian dibuat luka bakar pada 4 tempat yaitu pada punggung kanan dan kiri serta paha kanan dan kiri masing – masing berdiameter ± 3 cm dengan menggunakan tembaga yang telah dipanaskan pada suhu 250° C. Sedangkan pengobatan dilakukan 3 kali sehari dengan cara mengoleskan sediaan gel secara merata, tipis serta sama banyak selama 21 hari.

Pengamatan uji histopatologi secara mikroskopik

Pada jaringan kulit bekas luka dilakukan biopsi dari 1 ekor kelinci setiap kelompok pada hari ke-1, 2, 3, 5, 7, 14, dan 21. Kulit kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis dan dimasukkan dalam dapar formalin 10% selama 48 jam. Jaringan kemudian didehidrasi dengan larutan etanol 70%, 80%, 95%, etanol absolut, xilol, dan diblok dengan lemak parafin. Jaringan kulit kemudian dipotong dengan mikrotom setebal 5 μ m, diletakkan pada gelas objek, dilakukan pewarnaan menggunakan *hematoxyllin-eosin* serta pengamatan secara mikroskopik⁽¹⁵⁾.

Pengamatan uji histokimia dengan mengukur kandungan hidroksiprolin

Pada bagian kulit kelinci bekas luka dilakukan biopsi pada hari ke 21. Jaringan kulit kemudian dikeringkan pada suhu 60°C selama 12 jam dan dihidrolisa dengan HCl 6 N selama 24 jam pada suhu 110°C. Setelah dinetralkan, sampel sebanyak 200 μ L dicampur dengan 1 mL CuSO₄ 0,01 N, 1 mL NaOH 2,5 N, dan 1 mL H₂O₂ 6%. Larutan kemudian diaduk dan diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit. Setelah proses inkubasi selesai, larutan didinginkan dan ditambahkan 4 mL H₂SO₄ 3M dan 2 mL 2-dimetilaminobenzaldehid 5%. Sampel diinkubasi kembali pada suhu 70°C selama 16 menit, didinginkan pada suhu 20°C dan diukur serapannya pada panjang gelombang 500 nm menggunakan spektrofourometer. Jumlah hidroksiprolin dalam sampel dihitung terhadap kurva standar l- hidroksiprolin⁽¹⁵⁾.

Analisis Data

Berdasarkan hasil pengamatan uji histopatologi secara mikroskopik dapat diamati gambaran histologi untuk parameter – parameter : nekrosis, infiltrasi sel radang, infiltrasi sel mononuklear, haemorrhagi, kalsifikasi, hyalin, regenerasi. Dan dari pengamatan parameter – parameter tersebut kemudian diberikan suatu skor lesio dan kesimpulan akhir. Sedangkan kandungan hidroksiprolin pada uji histokimia dihitung terhadap kurva standar.

HASIL

Hasil pengujian standarisasi fraksi ekstrak pegagan yang digunakan sebagai bahan aktif dalam pembuatan sediaan topikal pengobatan luka bakar ditunjukkan pada Tabel 2. Data hasil uji histopatologi setiap kelompok perlakuan pada pengamatan hari ke 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21 ditunjukkan pada Tabel 3, sedangkan rincian hasil pengamatan

Tabel 2. Standarisasi fraksi ekstrak pegagan untuk beberapa parameter

Parameter	Hasil
Identifikasi	
<ul style="list-style-type: none"> Nama fraksi : fraksi butanol herba pegagan Nama latin : <i>Centella asiatica</i> Leach Bagian tanaman : herbal Nama Indonesia : pegagan Senyawa identitas : <i>asiaticoside</i> 	
Data kimia fisika	
<ul style="list-style-type: none"> Penampakan dan deskripsi fisik 	Membentuk lapisan tipis, berwarna hijau kekuningan hingga kuning kecoklatan, berbau khas dan berasa pahit.
<ul style="list-style-type: none"> Kandungan air 	3,66%
<ul style="list-style-type: none"> Bagian larut dalam air 	82,31%
<ul style="list-style-type: none"> Bagian larut dalam etanol 	64,96%
<ul style="list-style-type: none"> Bercak KLT 	Menunjukkan (+) asiaticoside
<ul style="list-style-type: none"> Kandungan Asiaticoside 	3,95%
<ul style="list-style-type: none"> Susut pengeringan 	1,72 %
<ul style="list-style-type: none"> Kadar air 	3,66 %
<ul style="list-style-type: none"> Kadar abu 	23,23 %
Logam berat	
<ul style="list-style-type: none"> Timbal 	< 0,05 ppm
<ul style="list-style-type: none"> Arsen 	< 0,002 ppm
<ul style="list-style-type: none"> Kadmium 	< 0,01 ppm
Kandungan mikroba dan kapang	
<ul style="list-style-type: none"> Angka mikroba 	< 10
<ul style="list-style-type: none"> Angka kapang 	< 10

mikroskopis dan diagnosanya ditunjukkan pada Gambar 1 – 6.

Data hasil pengujian kandungan hidroksiprolin ditunjukkan pada Gambar 7. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kelompok kelinci 6 yang diobati dengan sediaan mengandung fraksi ekstrak pegagan 1,5 % memiliki kadar hidroksiprolin paling tinggi dibandingkan sediaan lainnya yakni 1.109µg/100 mg jaringan.

PEMBAHASAN

Hasil karakterisasi terhadap fraksi ekstrak pegagan yang ditunjukkan pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa fraksi ekstrak pegagan yang digunakan telah memenuhi standar persyaratan mutu ekstrak parameter spesifik dan parameter non spesifik maupun parameter - parameter yang disyaratkan dalam Farmakope Herbal Indonesia.

Analisis pada data hasil uji histopatologi pada Tabel 3 dan Gambar 6 menunjukkan bahwa kelompok kelinci 6 yang diobati

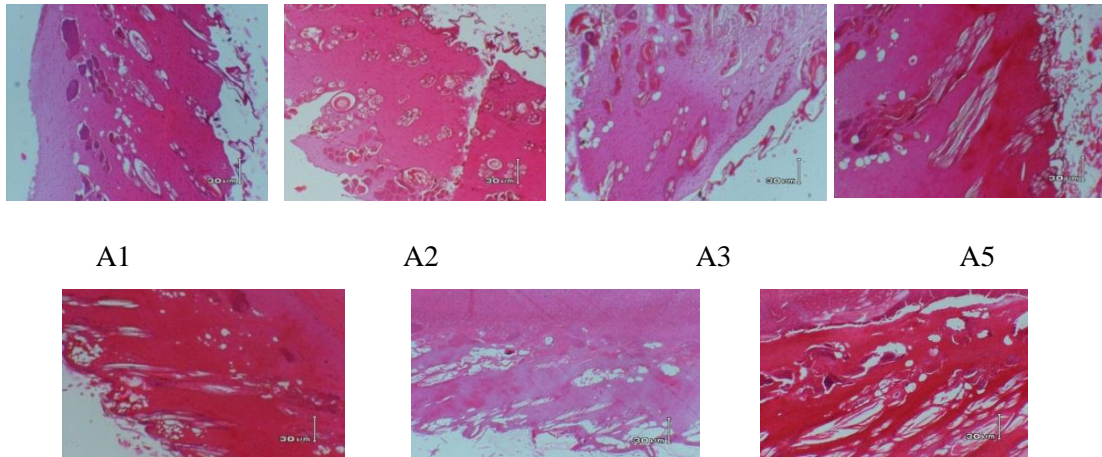
dengan sediaan gel yang mengandung fraksi ekstrak pegagan 1,5% memberikan hasil penyembuhan tercepat yakni proses regenerasi kulit sudah terjadi pada hari ke-2. Sedangkan kelompok kelinci 1 (Tabel 3 dan Gambar 1) yang diobati dengan basis gel hingga hari ke 21 setelah pengobatan, kulit kelinci baru

menunjukkan mulai regenerasi. Di sisi lain kelompok kelinci 2 yang diobati dengan OLB 1 (Tabel 3 dan Gambar 2) dan kelompok kelinci 3 yang diobati dengan OLB 2 (Tabel 3 dan Gambar 3) masing – masing menunjukkan telah terjadi regenerasi

Tabel 3. Hasil uji histopatologi dan skor lesio pada kulit kelinci yang telah diobati dengan beberapa formula sediaan wound healing

No.	Perlakuan	Gambaran histopatologi							Skor	Kesimpulan
		Nekrosis	Infiltrasi sel radang	Infiltrasi sel mononuklear	Haemorraghi	Kalsifikasi	Hyalin	Regenerasi		
I. Kelompok 1										
1.	A1	√	-	-	-	-	√	-	+1	Nekrosis epidermis
2.	A2	√	√	-	-	-	-	-	+2	Nekrosis epidermis
3.	A3	√	√	-	√	-	√	-	+3	Nekrosis epidermis
4.	A5	√	√	-	√	-	√	-	+3	Nekrosis epidermis
5.	A7	√	√	-	-	-	√	-	+2	Nekrosis epidermis
6.	A14	√	√	√	-	√	√	√	+1	Mulai beregenerasi
7.	A21	√	√	√	√	-	-	√	+1	Mulai beregenerasi
II. Kelompok 2										
1.	B1	√	-	-	-	-	-	-	+1	Nekrosis epidermis
2.	B2	√	-	-	-	-	√	-	+1	Nekrosis epidermis
3.	B3	√	-	-	-	√	√	√	+2	Mulai beregenerasi
4.	B5	√	-	-	√	√	-	√	+2	Mulai beregenerasi
5.	B7	√	√	√	√	-	√	√	+2	Regenerasi
6.	B14	√	-	√	-	-	√	√	+1	Regenerasi
7.	B21	√	-	√	-	-	√	√	+1	Regenerasi
III. Kelompok 3										
1.	C1	√	-	-	-	-	-	-	+1	Nekrosis epidermis
2.	C2	√	-	-	-	-	√	-	+1	Nekrosis epidermis

No.	Perla- kuan	Gambaran histopatologi							Skor	Kesimpulan
		Nek- rosis	Infiltra- si sel radang	Infiltra si sel monon uklear	Hae- mor- rhagi	Kal- sifi- kasi	Hya- lin	Rege- ne- rasi		
3.	C3	√	√	√	√	-	√	√	+3	Mulai beregenerasi
4.	C5	√	√	√	√	√	√	√	+3	Mulai beregenerasi
5.	C7	√	√	√	-	-	-	√	+2	Mulai beregenerasi
6.	C14	√	√	-	-	-	√	√	+1	Regenerasi
7.	C21	-	√	√	-	-	-	√	+1	Regenerasi
IV. Kelom pok 4										
1.	D1	√	-	-	-	-	-	-	+1	Nekrosis epidermis
2.	D2	√	-	-	-	-	√	-	+1	Nekrosis epidermis
3.	D3	√	-	-	-	-	√	-	+1	Nekrosis epidermis
4.	D5	√	-	-	-	-	√	-	+1	Nekrosis epidermis
5.	D7	√	√	√	-	-	√	-	+2	Nekrosis epidermis
6.	D14	√	√	√		√	√	√	+1	Mulai beregenerasi
7.	D21	√	√	√	-	-	√	√	+1	Mulai beregenerasi
V. Kelom pok 5										
1.	E1	√	-	-	-	-	-	-	+1	Nekrosis epidermis
2.	E2	√	√	-	-	-	√	-	+2	Nekrosis epidermis
3.	E3	√	-	-	-	-	√	√	+1	Regenerasi
4.	E5	√	-	-	-	-	√	√	+1	Regenerasi
5.	E7	√	√	√	-	-	√	√	+1	Regenerasi
6.	E14	-	√	√	-	-	√	√	0	Regenerasi
7.	E21	-	-	-	-	-	-	√	0	Regenerasi
VI. Kelom pok 6										
1.	F1	√	-	-	-	-	-	-	+1	Nekrosis epidermis
2.	F2	√	-	-	-	-	√	√	+1	Regenerasi
3.	F3	-	-	√	-	-	√	√	0	Regenerasi
4.	F5	√	-	-	√	-	-	-	+1	Regenerasi
5.	F7	√	-	-	-	-	-	√	+1	Regenerasi
6.	F14	√	-	√	√	-	√	-	+2	Regenerasi
7.	F21	-	√	√	-	-	-	√	0	Regenerasi



	A1	A2	A3	A5	A7	A14	A21
Kel 1 hari ke 1 (A1)	Nekrosis pada epidermis dan folikel rambut, desquamasi folikel rambut, hyalinasi dan terdapat sel debris.						
Diagnosa	Nekrosis epidermis kulit (+)						
Kel 1 hari ke 2 (A2)	Nekrosis pada epidermis dan folikel rambut, desquamasi folikel rambut, tidak dijumpai hyalin, infiltrasi sel eosinofil, terdapat beberapa folikel rambut yang intak dan terdapat sel debris.						
Diagnosa	Nekrosis epidermis kulit (++)						
Kel 1 hari ke 3 (A3)	Nekrosis pada epidermis dan folikel rambut, haemorrhagi, hyalinasi, infiltrasi sel eosinofil dan terdapat sel debris.						
Diagnosa	Nekrosis epidermis kulit (+++)						
Kel 1 hari ke 5 (A5)	Nekrosis pada epidermis dan folikel rambut, haemorrhagi, hyalinasi dan infiltrasi sel eosinofil.						
Diagnosa	Nekrosis epidermis kulit (+++)						
Kel 1 hari ke 7 (A7)	Nekrosis pada epidermis dan folikel, hyalinasi, infiltrasi sel eosinofil dan terdapat sel debris.						
Diagnosa	Nekrosis epidermis kulit (++)						
Kel 1 hari ke 14 (A14)	Nekrosis pada epidermis dan folikel rambut, kalsifikasi, hyalinasi, hiperseluler, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil dan terdapat terdapat sel debris.						
Diagnosa	Regenerasi epidermis kulit (+).						
Kel 1 hari ke 21 (A21)	Terdapat lapisan epidermis yang intak, nekrosis epidermis dan folikel rambut, haemorrhagi, hiperseluler, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil dan sel debris.						
Diagnosa	Regenerasi epidermis kulit (+)						

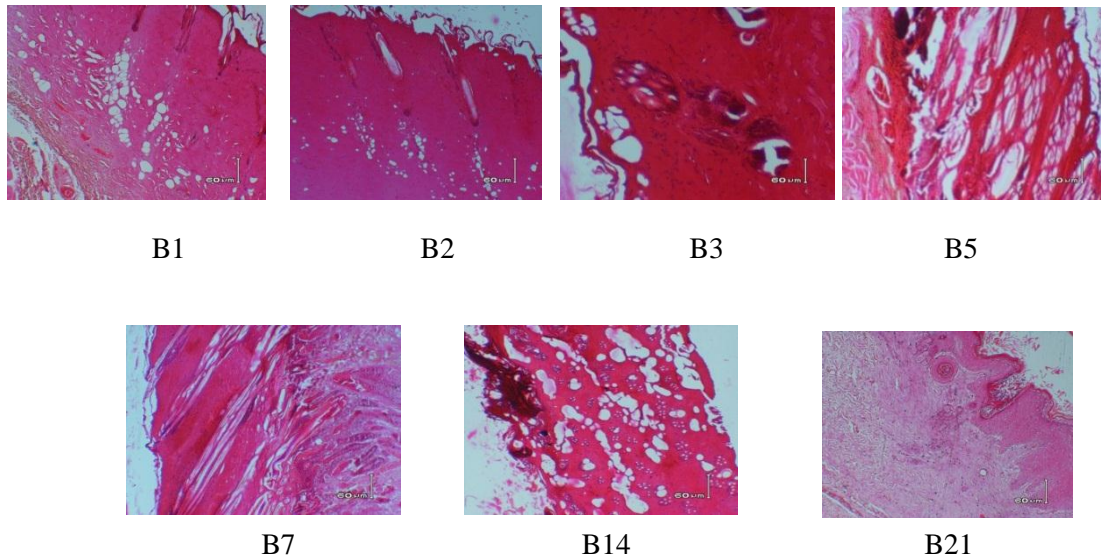
Gambar 1. Hasil uji histopatologi dan diagnosa kelompok kelinci 1 pada hari 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21

kulit pada hari ke 7 dan ke 14. Hal ini berarti penyembuhan luka bakar dengan OLB 1 dan OLB 2 adalah lebih lambat dibandingkan dengan penyembuhan luka bakar menggunakan sediaan gel yang mengandung fraksi ekstrak pegagan 1,5%. Analisis pada data uji histopatologi juga menunjukkan bahwa semakin tinggi kandungan fraksi ekstrak pegagan pada sediaan, maka proses regenerasi

berlangsung lebih cepat yakni hari ke 2 (kandungan fraksi ekstrak pegagan 1,5 %), hari ke 3 (kandungan fraksi ekstrak pegagan 1,0 %), dan hari ke 14 (kandungan fraksi ekstrak pegagan 0,5%). Hal ini menunjukkan bahwa fraksi ekstrak pegagan memegang peranan penting dalam proses penyembuhan luka bakar pada kulit kelinci. Sedangkan bila dilihat pada proses akhir penyembuhan pada

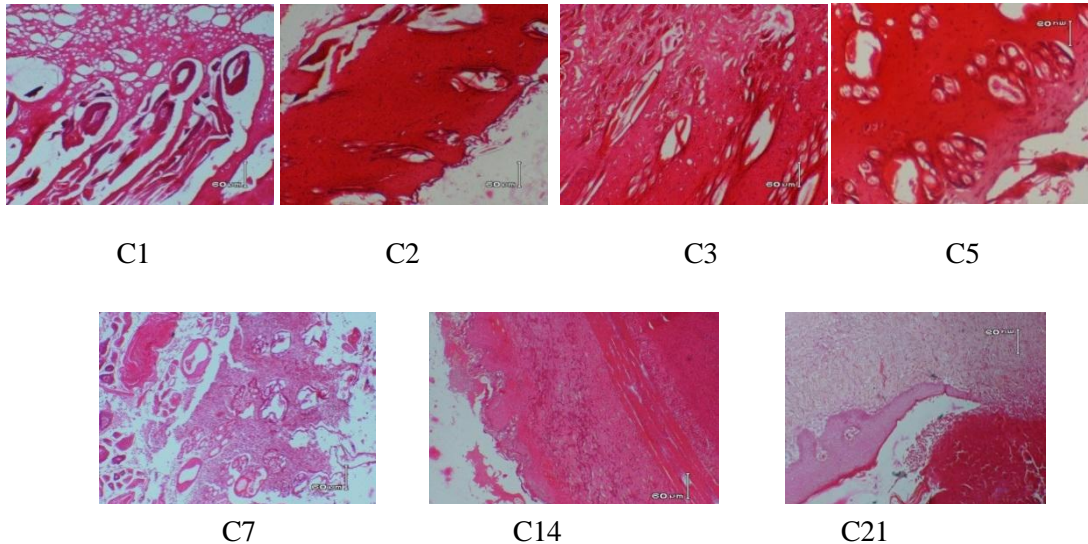
hari ke-21, semua kelompok perlakuan dan kontrol positif sudah mengalami regenerasi sel, sedangkan kontrol negatif yang hanya

diberi basis gel (kelompok kelinci 1) belum mengalami regenerasi sel.



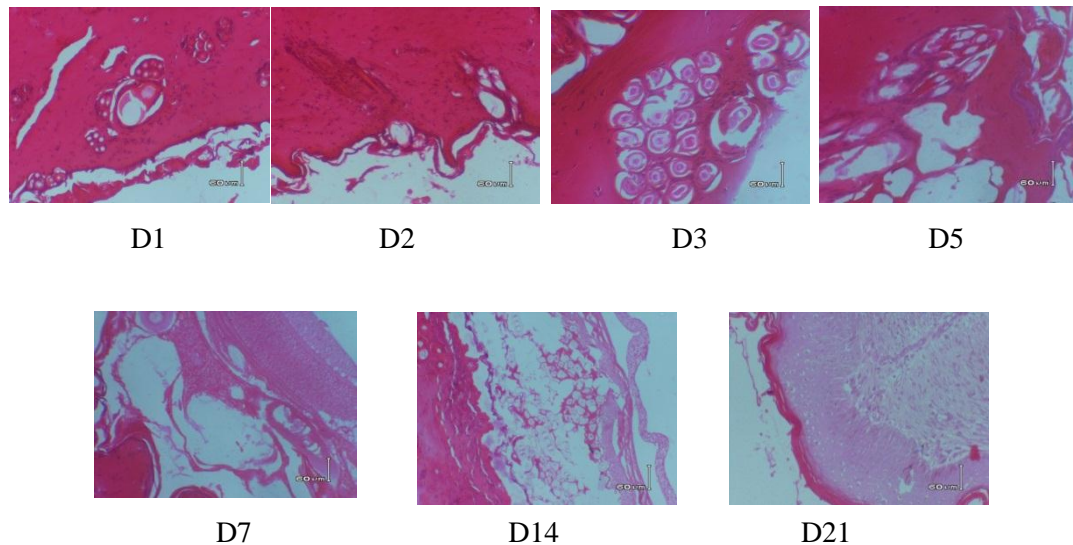
- Kel 2 hari ke 1 (B1) : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, vakuolisasi pada lapisan subepidermis dan sel debris.
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
 Kel 2 hari ke 2 (B2) : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, terdapat spot pertumbuhan hyalin dan desquamasi sel epitel kulit.
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
 Kel 2 hari ke 3 (B3) : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, kalsifikasi, hyalinasi dan sel debris.
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (++)
 Kel 2 hari ke 5 (B5) : Nekrosis epidermis, endodermis dan folikel rambut, kalsifikasi, haemorrhagi dan sel debris.
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (++)
 Kel 2 hari ke 7 (B7) : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, hyalinasi, haemorrhagi, hyperseluler, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil dan sel debris.
Diagnosa : Regenerasi epidermis kulit (++)
 Kel 2 hari ke 14 (B14) : Folikel rambut mulai mengalami regenerasi, hyalinasi, nekrosis bagian endodermis, hiperseluler, infiltrasi sel makrofag dan sel debris.
Diagnosa : Regenerasi epidermis kulit (+).
 Kel 2 hari ke 21 (B21) : Folikel rambut mulai mengalami regenerasi, hyalinasi, hiperseluler, nekrosis endodermis, infiltrasi sel makrofag dan sel debris.
Diagnosa : Regenerasi epidermis kulit (+)

Gambar 2 : Hasil uji histopatologi dan diagnosa kelompok kelinci 2 hari 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21



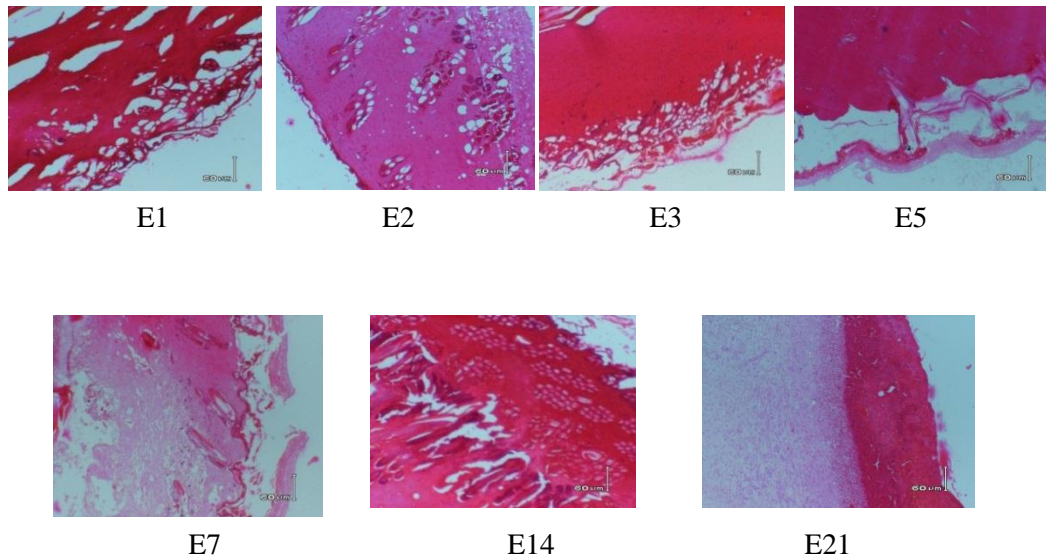
- Kel 3 hari ke 1 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, dan vakuolisasi pada subepidermis.
(C1)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
Kel 3 hari ke 2 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, dan hyalinasi.
(C2)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
Kel 3 hari ke 3 : Nekrosis epidermis, folikel rambut dan endodermis, hyperseluler, haemorrhagi, infiltrasi sel eosinofil dan makrofag, hyalinasi dan sel debris.
(C3)
Diagnosa : Nekrosis epidermis (kulit mulai mengalami regenerasi) (+++).
Kel 3 hari ke 5 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, hyperseluler, hyalinasi, haemorrhagi, infiltrasi sel eosinofil dan makrofag, kalsifikasi dan sel debris.
(C5)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (kulit mengalami regenerasi) (+++).
Kel 3 hari ke 7 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, terdapat sel debris, infiltrasi sel eosinofil dan makrofag dan hyperseluler.
(C7)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (proses regenerasi kulit) (++).
Kel 3 hari ke 14 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, terdapat sel debris, sedikit hyalin dan infiltrasi sel eosinofil, dan hyperseluler.
(C14)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (proses regenerasi kulit). (+).
Kel 3 hari ke 21 : Epidermis terlihat baik dan intak, hyperseluler, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil.
(C21)
Diagnosa : Regenerasi kulit (+).

Gambar 3. Hasil uji histopatologi dan diagnose kelompok kelinci 3 hari 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21



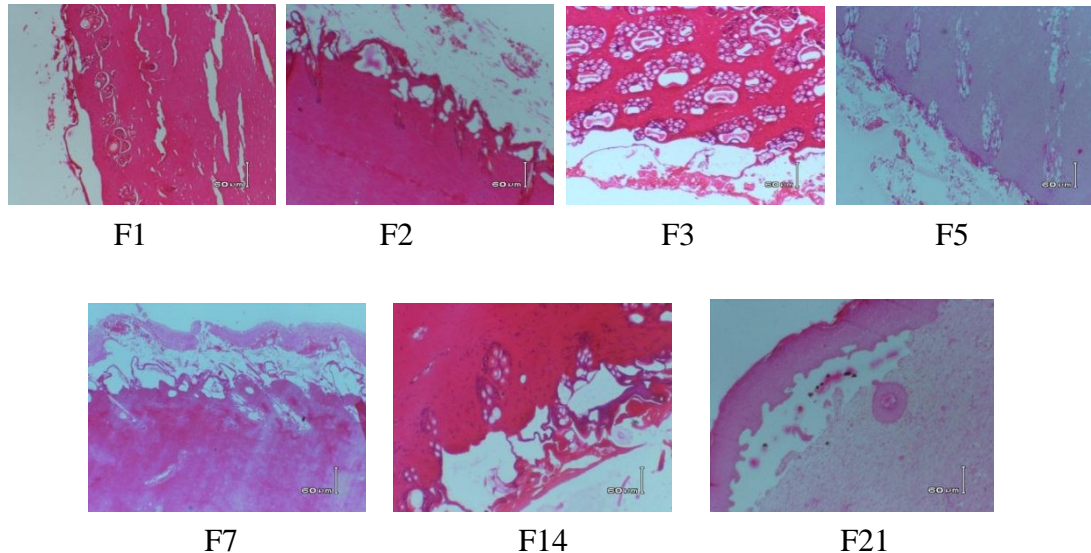
- Kel 4 hari ke 1 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, terdapat folikel rambut yang intak dan sel debris.
(D1)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+)
- Kel 4 hari ke 2 : Nekrosis epidermis kulit, hyperselular dan hyalinasi.
(D2)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
- Kel 4 hari ke 3 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, terdapat folikel rambut yang intak dan hyalinasi.
(D3)
Diagnosa : Nekrosis epidermis (+).
- Kel 4 hari ke 5 : Nekrosis epidermis kulit dan folikel rambut, hyalinasi dan se; debris.
(D5)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
- Kel 4 hari ke 7 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, hyalinasi, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil dan sel debris.
(D7)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (++).
- Kel 4 hari ke 14 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut, kalsifikasi, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil, hyalinasi, sel debris dan hyperseluler.
(D14)
Diagnosa : Regenerasi epidermis kulit (+).
- Kel 4 hari ke 21 : Nekrosis epidermis, tidak ditemukan folikel rambut, sel debris, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil dan hyalinasi.
(D21)
Diagnosa : Regenerasi epidermis kulit (+).

Gambar 4. Hasil uji histopatologi dan diagnosa kelompok kelinci 4 pada hari 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21



- Kel 5 hari ke 1 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut.
(E1)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
Kel 5 hari ke 2 : Nekrosis epidermis kulit dan folikel rambut, hyalinasi, infiltrasi sel eosinofil dan sel debris.
(E2)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (++).
Kel 5 hari ke 3 : Nekrosis folikel rambut, terdapat beberapa folikel rambut yang intak, hypoerseluler dan hyalinasi.
(E3)
Diagnosa : Regenerasi kulit (+).
Kel 5 hari ke 5 : Nekrosis epidermis kulit, regenerasi folikel rambut dan hyalinasi.
(E5)
Diagnosa : Regenerasi kulit (+).
Kel 5 hari ke 7 : Nekrosis epidermis kulit, regenerasi folikel rambut, hyalinasi, hyperseluler dan infiltrasi sel makrofag dan eosinofil.
(E7)
Diagnosa : Regenerasi kulit (+).
Kel 5 hari ke 14 : Regenerasi folikel rambut, hyperseluler, infiltrasi sel makrofag dan eosinofil dan hyalinasi.
(E14)
Diagnosa : Regenerasi epidermis kulit (0).
Kel E hari ke 21 (E21) : Regenerasi kulit dan vaskularisasi.
Diagnosa : Regenerasi kulit (0).

Gambar 5 : Uji histopatologi dan diagnosa kelompok kelinci 5 pada hari 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21



- Kel 6 hari ke 1 : Nekrosis epidermis dan folikel rambut.
(F1)
Diagnosa : Nekrosis epidermis kulit (+).
Kel 6 hari ke 2 : Nekrosis epidermis kulit, folikel rambut mulai mengalami regenerasi dan
(F2) hyalinasi.
Diagnosa : Regenerasi kulit (+).
Kel 6 hari ke 3 : Regenerasi folikel rambut, hyalinasi, infiltrasi sel makrofag dan sel debris.
(F3)
Diagnosa : Regenerasi kulit (0).
Kel 6 hari ke 5 : Nekrosis epidermis kulit dan folikel rambut, dan haemorrhagi.
(F5)
Diagnosa : Regenerasi (+).
Kel 6 hari ke 7 : Nekrosis epidermis kulit dan sel debris.
(F7)
Diagnosa : Regenerasi kulit (+).
Kel 6 hari ke 14 : Nekrosis subepidermis, haemorrhagi, infiltrasi sel makrofag, hyalinasi dan
(F14) sel debris.
Diagnosa : Regenerasi (++).
Kel 6 hari ke 21 : Hyperselular, regenerasi kulit, infiltrasi sel eosinofil dan makrofag dan
(F21) folikel rambut mulai tumbuh kembali.
Diagnosa : Regenerasi kulit (0).

Gambar 6. Uji histopatologi dan diagnose kelompok kelinci 6 pada hari 1, 2, 3, 5, 7, 14 dan 21

Dari hasil uji histopatologi dapat disimpulkan bahwa fraksi ekstrak pegagan mempunyai peran dalam proses regenerasi kulit, dan akan semakin efektif dengan meningkatnya jumlah fraksi ekstrak. Hal ini

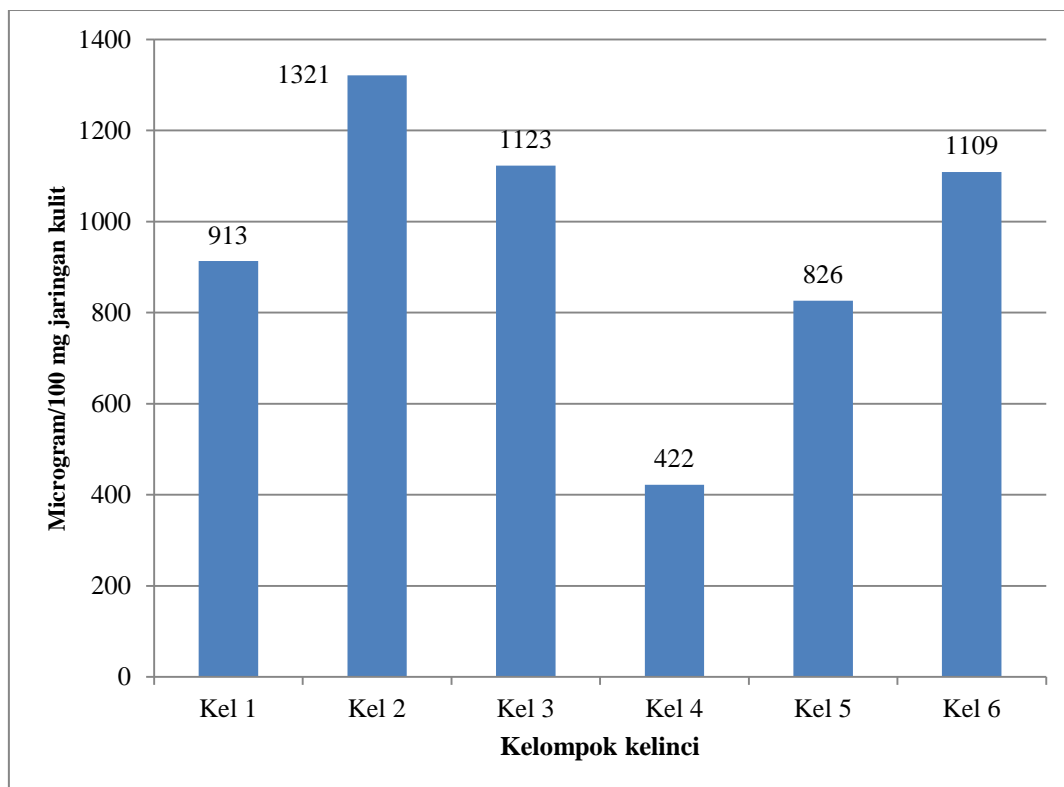
diduga erat kaitannya dengan naiknya jumlah kandungan senyawa aktif *asiaticoside* di dalam sediaan sesuai naiknya jumlah fraksi ekstrak pegagan dalam sediaan. Bila dibandingkan dengan hasil uji hispatologi

dengan perlakuan menggunakan sediaan kode OLB 1 dan OLB 2, maka sediaan mengandung fraksi ekstrak pegagan 1,5 % dan 1 % memberikan efektivitas khasiat penyembuhan luka bakar yang lebih baik yakni regenerasi pada hari ke 2 dan ke 3 dibandingkan sediaan Kode OLB 1 dan Kode OLB 2 yakni masing – masing pada hari ke 7 dan ke 14. Sedangkan basis sediaan hingga hari ke 21 belum menunjukkan proses regenerasi.

Peranan fraksi ekstrak pegagan dalam meningkatkan kandungan hidroksiprolin ditunjukkan oleh kandungan hidroksiprolin pada kelompok kelinci 4, 5 dan 6. Hal ini menunjukkan peran fraksi ekstrak pegagan dalam pembentukan hidroksiprolin, yaitu semakin tinggi kadar fraksi ekstrak dalam sediaan semakin tinggi hidroksiprolin yang

terbentuk, sehingga proses penyembuhan akan semakin lebih cepat.

Sedangkan kandungan hidroksiprolin pada kelompok kelinci yang diobati dengan sediaan OLB 1 dan OLB 2 menunjukkan kandungan yang lebih tinggi. Hal ini diduga oleh karena kedua sediaan OLB 1 dan OLB 2 yang didapatkan di apotik tersebut tidak menggunakan bahan aktif ekstrak tanaman melainkan menggunakan bahan aktif berupa antibiotika atau bioplasenton. Rendahnya kandungan hidroksiprolin pada kelompok 4 dan 5 dibandingkan dengan kontrol negatif (kelompok 1) diduga karena pada sampel kulit kelinci yang diuji yakni biopsi hari ke 21- proses regenerasi kulit pada sampel kelompok 1 justru baru mulai, sehingga kandungan hidroksiprolinnya tinggi.



Gambar 7. Kandungan hidroksiprolin pada kulit kelinci kelompok 1 – 6 setelah diobati dengan beberapa sediaan luka bakar.

Sementara pada kelompok 4 dan 5 justru proses regenerasi kulit telah mendekati akhir, sehingga kandungan hidroksiprolinnya rendah. Oleh karena itu untuk penelitian selanjutnya prosedur penentuan harus dilakukan mulai dari hari ke 1 hingga ke 21, sehingga dapat mewakili secara keseluruhan proses penyembuhan.

KESIMPULAN

Hasil pengujian khasiat pengobatan luka bakar sediaan topikal mengandung bahan aktif fraksi ekstrak pegagan terhadap kulit kelinci berdasarkan uji histopatologi dan histokimia menunjukkan khasiat mampu menyembuhkan luka bakar yang baik serta tidak menimbulkan efek samping seperti alergi dan kematian pada hewan coba. Hasil uji khasiat juga menunjukkan bahwa formula sediaan yang menandung fraksi ekstrak pegagan 1,5 % merupakan formula yang terbaik yakni mampu meregenerasi kulit yang paling cepat yakni pada hari ke – 2 dan kadar hidroksiprolin paling tinggi yakni 1.109 mikrogram/100 mg jaringan kulit bila dibandingkan terhadap formula yang mengandung fraksi ekstrak pegagan 0,5 % dan 1,0 %.

Hasil uji khasiat secara keseluruhan juga menunjukkan bahwa sediaan topikal untuk pengobatan luka bakar menggunakan bahan aktif fraksi ekstrak pegagan terbukti aman untuk digunakan selama penelitian *in-vivo* pada kelinci. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terjadinya kejadian alergi dan peradangan luka yang ditandai oleh naiknya suhu pada badan kelinci serta tidak ditemukan adanya kematian pada kelinci selama penelitian dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Kementrian Riset dan Teknologi atas dukungan dana melalui program Program Insentif Riset untuk Peneliti dan

Perekayasa, BALITNAK Bogor atas kerjasama dalam penggunaan fasilitas ruangan pemeliharaan kelinci dan Dr. Yulvian Sani atas bantuan analisis dan interpretasi uji histopatologi.

DAFTAR RUJUKAN

1. Anonim. 2009. <http://www.lukabakar.org>. Pemutakhiran Tatalaksana Perawatan Pasien Luka Bakar. Diakses pada tanggal 1 Oktober 2009.
2. Anonim. 2009. Luka bakar. http://id.wikipedia.org/wiki/Luka_bakar. Diakses tanggal 1 Oktober 2009.
3. Moenadjat Yefta, 2003. Luka Bakar Pengetahuan Klinik Praktis. Edisi V. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1-7.
4. Anonim. 2009. http://en.wikipedia.org/wiki/Centella_asiatica. Diakses tanggal 1 Oktober 2009.
5. Shin Pil-Jong et al. 1996. Asiaticoside mimetic as wound healing agent. Biorganic & medical Chemistry Letters Vol 6 no.24 pp 2937-2940.
6. Kimura Yoshiyuki et al. 2008. Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. European Journal of Pharmacology 584 (2008) 415–423.
7. Rao Vishnu. G., et al. 1996. Influence Of Aqueous Extract Of Centella As/At/Ca (Brahmi) On Experimental Wounds In Albino Rats. Indian Journal of Pharmacology 28: 249-253.
8. Shukla .A. et al. 1999. In Vitro and in Vivo Wound Healing Activity of Asiaticoside Isolated from Centella asiatica. Journal of Ethnopharmacology 65:1–11.
9. Somchit. M.N,et al. 2004. Antinociceptive and antiinflammatory effects of Centella Asiatica. Indian Journal Pharmacol. Vol 36. Issue 6 : 377-380.
10. Anonim. 1998. Committee for Veterinary Medicinal Product Centella asiatica extract Summary Report. The European Agency For The Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMEA/MRL/494/98- FINAL.
11. Quan-Lin Yu, Hong-Quan Duan, Yoshihisa Takaishi dan Wen-Yuan Gao. 2006. A Novel

- Triterpene from *Centella asiatica*. *Molecules*, 11: 661-665
12. Anonim. 2005. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta
 13. Anonim. 2004. *Monography of Indonesian Medicinal Plant Extract*. Volume National Agency of Drug and Food Control The Republic of Indonesia.
 14. Sikareepaisan P et al 2008. Electrospun gelatin fiber mats containing a herbal—*Centella asiatica*—extract and release characteristic of asiaticoside. *Nanotechnology* 19. 015102 (10pp)
 15. Gurung Shila et al. 2009. Wound healing properties of *Carica papaya* latex: In vivo evaluation in mice burn model. *Journal of Ethnofarmacology* (121). 338- 341